



特許願

昭和47年8月4日

特許庁長官 三宅幸夫

1. 発明の名称 ハツキウカウ 発酵法によるローメチオニンの製造法

2. 発明者 住 所 神奈川県川崎市幸区小倉1060
氏 名 中森茂3. 特許出願人 郵便番号 104
住 所 東京都中央区京橋1丁目6番地
電話番号 東京(03)272-1111番(代表)
名 称 (006)味の素株式会社
代表者 取締役社長 鈴木恭二

4.添付書類の目録

(1) 明細書 1通

47 078237

⑯ 日本国特許庁

公開特許公報

⑪特開昭 49-35580

⑬公開日 昭49.(1974)4.2

⑭特願昭 47-78237

⑮出願日 昭47.(1972)8.4

審査請求 未請求 (全3頁)

庁内整理番号

7025 49 36(2)D251

⑯日本分類

れているが、その量については明示されていない。発明者らは発酵法によるローメチオニンの製造法について検討した結果、ブレビバクテリウムに属する細菌でメチオニンのアナログであるエチオニンに耐性を示す菌株の中には培地中にローメチオニンを蓄積するものが多く存在することを発見しこの発明を完成した。

この発明において使用される菌株はブレビバクテリウムに属するもの(バージーのマニユアル・オブ・デタクティイティブバクテリオロジイ、オフ版により決定)で、メチオニンのアナログであるエチオニンによって生産阻害を受けないエチオニン耐性株である。またエチオニン耐性以外にさらに他の薬剤耐性あるいは栄養要求性等を付与することもローメチオニンの生産性を上げる目的で有利である。本発明に使用される代表的な菌株としてはブレビバクテリウム・フランシス-332、TE-100等があり、このうちTE-100はエチオニン耐性、スレオニン要求性株である。ブレビバクテリウム・フラン

明細書

1. 発明の名称 発酵法によるローメチオニンの
製造法

2. 特許請求の範囲

ブレビバクテリウム属に属し、ローメチオニン生産能を有する細菌を栄養培地に培養し、生成したローメチオニンを採取することを特許とする発酵法によるローメチオニンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

この発明はブレビバクテリウムに属する細菌で培地中にローメチオニンを生成蓄積する菌株を培養し、ローメチオニンを単離回収して製造する方法に関するものである。ローメチオニンは現在までもつばら合成法で製造されている。微生物がローメチオニンを培地中に分離する例としては、大腸菌、サルモネラ等のエチオニン、ローメチルメチオニン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシイミン等の耐性株について知ら

バムエ-332は工業技術院発明研究所に做工
研磨寄付/542号として寄託されている。

この発明に使用されるエチオニン耐性株、ブ
レビベクテリウム・フラバムエ-332と感受
性株ブレビベクテリウム・フラバムE-2247
の両者についてエチオニン含有培地での生育の
変化を調べたところ表-1のような結果であつ
た。

表-1の結果から明らかにようにエチオニンの
濃度が高くなるにつれて感受性株の生育が阻害
されるのに対して耐性株では無添加の場合とほ
とんど変わらない生育が見られた。

表-1

DL-エチオニン(mg/45)	相対生育度(%)	
	ブレビベクテリウム・ フラバムE-332	ブレビベクテリウム・ フラバムE-2247
0	100	100
0.25	8.4	9.7
0.50	1.6	1.01
1.0	1.5	9.8
2.5	1.0	8.5

サイアミン(1塩酸塩)
添加量 金属性液 0.1 mg

無微量金属液

1 liter当たり含有量

硫酸ソーダ	6.8 mg
セリブデン酸 アンモニウム	3.7 mg
塩化オキシ鉄	9.70 mg
硫酸亜鉛	6.800 mg
塩化マンガン	7.2 mg

この発明におけるエチオニン耐性株とは上記
の最少培地に DL-エチオニン 0.5 mg/45となる
ように添加した培地での 24 時間後の生育が無
添加時の 50% 以上の菌株と定義する。

L-メチオニンの生産のための培地は特に制
限するところではなく、通常の菌の生育が見られ
る条件がかなつている。すなわち炭素源と
してグルコース、ガルトース、フラクトース、で
んぶん、あるいはセルロース等の加水分解物、
高糖度等の炭水化物、酢酸、クエン酸等の有機

(注)

上の結果は試験管に分注した下記組成のメチ
オニンを含まない最少培地 45 ml に DL-エチ
オニン(シグマ社製)を表記の濃度添加した
培地を作り、それぞれに、ペプトン 1%、酵
母エキス 1%、NaCl 0.5%、グルコース 0.5
%を含む培地で 30°C、16 時間培養した菌
体を集め、0.1 M リン酸緩衝液で洗浄後、菌
濃度が約 1.07/45 となるように植えつけ 50
°C、24 時間振盪培養した後の生育度を比較
したものである。

最少培地組成	水 100 ml 時間
グルコース	0.5 %
酵母エキス	0.15 %
リン酸 1カリウム	0.10 %
リン酸 2カリウム	0.30 %
尿素	0.15 %
硫酸マグネシウム(7水塩)	0.01 %
塩化カルシウム(2水塩)	0.0001 %
ビオチン	5 μg

酸類、エタノール、グリセリン等のアルコール
類等が使用される。炭素源としては酵安、尿素、
硝安、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、アンモ
ニア水等が、無機物としてはマグネシウム、カル
シウム、鉄、マンガン等、栄養要求性のある
場合はアミノ酸、核酸、ビタミン等を加え、必
要に応じて生育促進のために酵母エキス、カゼ
イン加水分解物、大豆の加水分解物等を加える。
さらにメチオニンを構成する硫黄を供給するた
めに過剰を硫黄化合物を添加すると好結果がえ
られる。

培養条件は通常の方法で pH 5~7、温度
20~40°C、で振盪または通気振盪する。培
養中に pH が低下する場合は、炭酸カルシウム
を別収蔵して加えるか、アンモニアで中和する。
有機酸を炭素源とする場合は培養中に pH が上
昇するので、有機酸または鉄酸を加えて中和す
る。24~72 時間培養を行なうと L-メチ
オニンが培地中に蓄積される。

L-メチオニンの単離は液相蒸発、イオン交

培養細胞処理等の方法により行なう。その粗製結晶については、ペーパーカロマトグラム上のR値、電気泳動の易動度、微生物定量法による生物活性値によりL-メチオニンの標品と一致することを確認した。L-メチオニンの定量はロイコノスト・クーメゼンテロイデス(ATCC 8042)による微生物定量法によつて行なつた。

実施例1

表-2に示したL-メチオニン生産用培地2.0Lを用つてフラスコに分注し、これにブレビバクテリウム・フラバムE-532を種えつけ30℃、66時間振盪培養し、0.41g/literのL-メチオニンが蓄積した。

表-2

	liter当たり含有量
グルコース	100 g
硫酸 鉄	5.0 g
リン酸1カリウム	1.5 g
硫酸マグネシウム(7水物)	0.4 g
ビオチン	200 μg

(1) 願書副本 1通

5. 前記以外の発明者

カマラシサスケ
 住 所 神奈川県鎌倉市佐助1-16-19
 氏 名 シ・イオ イサム
 佐野 勇

マサシ・マダカケ
 住 所 東京都町田市玉川学園8-21-2
 氏 名 サノコウノスケ
 佐野 勇之輔

サイアミン	500 μg
Z.	2 μg
Y.	2 μg
酵素(大豆加水分解物)	4 mg
炭酸カルシウム	50 g

実施例2

表-2に記載の培地にL-スレオニンを1mg/2Lとなるように添加した培地にブレビバクテリウム・フラバムE-532を実施例1と同様にして培養し、0.49g/LのL-メチオニンが蓄積した。

実施例3

実施例2で用いる培地にD-メチルシステインを2.5gとなるように添加した培地にブレビバクテリウム・フラバムE-532を実施例1と同様に培養し1.61g/LのL-メチオニンが蓄積された。

特許出願人 株式会社